

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 19-27 November 2018 di Instalasi Karantina Ikan, Pengendalian mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (KIPM) yang berada di kawasan Puspa Agro, Waru – Sidoarjo.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang dibudidayakan selama 3 bulan dalam kolam terpal bundar. Pemilihan kondisi fisik maupun umur lele dilakukan untuk mendapatkan lele dengan kondisi pencernaan yang baik. Kemudian media lain yang digunakan adalah *TSI Agar*, *Medium O/F basal*, *Glukosa*, *Laktosa*, *Sukrosa*, *Maltosa*, *Manitol*, *Dulcitol*, *Salicin*, *Inositol*, *Sorbitol*, *Arabinosa*, *Trehalosa*, *Xylosa*, *Gelatin*, *Motility*, *Indol*, *Simmons Citrate*, *Christensen's Urease*, *Methyl Red (MR)/MRVP*, *Arginin Dihydrolase*, *Aesculin Hydrolisis* (Oxoid, 1982).

Alat	Fungsi
Timbangan analitik	Untuk menimbang bahan
Cawan petri	Untuk membiakkan sel
Tabung reaksi	Untuk mereaksi dua atau lebih zat

Erlenmeyer	Untuk mencampur & mengukur cairan/larutan
Gelas ukur	Untuk mengukur volume larutan
Magnetik stirrer	Untuk menghomogenkan larutan
Mortar	Untuk menghaluskan bahan
Jarum ose	Untuk inokulasi bakteri
Pembakar Bunsen	Untuk pembakaran, pemanas, & sterilisasi jarum ose
Vortex	Untuk mencampur bahan yang telah dihancurkan dengan mortar
Mikro tube	Untuk menyimpan larutan yang mudah rusak apabila terkena cahaya
Laminar flow	Untuk inkubasi mikrobiologi
Autoclave	Untuk sterilisasi alat atau media
Inkubator	Untuk fermentasi & menumbuhkan media pada pengujian mikrobiologi
Lemari pendingin	Untuk menyimpan bahan atau larutan dalam suhu rendah

Alat	Fungsi
Dissection kit	Alat bedah yang digunakan untuk mempelajari struktur anatomi tubuh
Mikroskop	Untuk melihat objek yang sangat kecil
Objek glass	Untuk menempatkan objek yang akan dilihat/dianalisa dengan miikroskop
Cover glass	Untuk menutup objek yang telah diletakkan diatas kaca preparat
Kamera	Untuk mengabadikan hasil penelitian sebagai dokumen

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada usus ikan lele yang dibudidayakan pada kolam terpal bundar. Ikan lele yang digunakan sebagai sampel berumur 3 bulan. Pemilihan kondisi fisik maupun umur lele dilakukan untuk mendapatkan bakteri patogen yang terdapat pada usus ikan lele. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan tiga tahap metode yaitu Isolasi bakteri dari usus ikan lele, Pemurnian kultur bakteri patogen dan Uji GKO ( Gram, Katalase, Oksidase). Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel yang dianalisis dengan metode deskriptif (Oxoid, 1982).

### **3.4 Prosedur Penelitian**

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dalam lima langkah yang meliputi (1) pengambilan sampel usus ikan lele, (2) Isolasi bakteri pada usus ikan lele, (3) Tahap pemurnian kultur bakteri, (4) Uji GKO/Uji Pewarnaan gram (Gram, Katalase, Oksidase).

#### **1. Pengambilan Sampel Usus Ikan Lele**

Penelitian ini dimulai dengan mengambil ikan lele yang dibudidayakan pada kolam terpal bundar di Kelurahan Balarjosari RT 02 RW 07, Kecamatan Belimbing, Malang. Kemudian dilakukan tahap isolasi dan identifikasi bakteri di Instalasi Karantina Ikan, Pengendalian mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (KIPM) yang berada di kawasan Puspa Agro, Waru – Sidoarjo. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara membedah perut ikan lele dumbo (*Calrias gariepinus*) menggunakan pisau dalam ruangan pencucian. Kemudian mengeluarkan saluran pencernaan ikan lele dumbo dan diambil bagian usus. Setelah itu sampel dibersihkan menggunakan air bersih agar darah dalam usus lele tidak ada lagi dan mengatasi adanya kotoran yang terdapat pada usus, kemudian usus lele ditimbang sebanyak 100 gr. Setelah ditimbang, usus lele diurut dimasukkan kedalam cawan petri yang telah disterilkan. Wadah yang telah diisi dengan sampel diberikan label. Sampel yang telah diletakkan pada cawan petri kemudian dibawa ke ruangan penyimpanan bahan dan disimpan dalam *showcase*.

#### **2. Isolasi Bakteri Usus Ikan Lele**

Sampel yang masih dalam wadah selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan mortar. Sampel yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 1

gr dan diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis steril dengan pengenceran  $10^{-1} - 10^{-5}$ . Tujuan dilakukan pengenceran bertingkat yaitu memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan. Selanjutnya dilakukan pengujian lebih lanjut dengan mengisolasi bakteri usus ikan lele yang merupakan kandidat patogen (Waluyo, L. 2007).

Tahap isolasi bakteri patogen pada usus ikan lele ini menggunakan media *Tryptic Soy Agar* (TSA). Media nonselektif ini digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara bakteri. Media TSA steril dalam erlenmeyer steril dituangkan kedalam cawan petri. Isolasi bakteri usus ikan lele dilakukan dalam 3 cawan petri. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa dalam masing-masing 3 ulangan ini didapatkan hasil yang sama. Sampel dalam tabung reaksi pada pengenceran  $10^{-1}$  hingga pengenceran  $10^{-5}$  diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan pipet volume 1 ml steril, kemudian dituangkan kedalam masing-masing cawan petri dibungkus dan dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 x 24 jam. Seleksi awal dilakukan dengan memilih bakteri yang memiliki kenampakan koloni, bentuk, ukuran, dan warna yang berbeda. Bakteri yang memiliki karakter berbeda selanjutnya dimurnikan kembali di media yang sama (Hardiningsih *et al*, 2006).

### **3. Tahap Pemurnian Kultur Bakteri**

Pada tahap pemurnian, dimulai dengan memilih koloni-koloni yang berbeda sehingga didapatkan koloni tunggal (isolat murni). Pemurnian bakteri dilakukan dalam ruangan inokulasi dan inkubasi. Sebelum melakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu mensterilkan jarum ose dengan pembakaran bunsen, lalu disentuhkan pada permukaan

koloni bakteri kemudian diinokulasi pada permukaan medium TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan NA (*Natrium Agar*) dengan metode gores untuk mendapatkan koloni yang terpisah, ini dilakukan beberapa kali sehingga didapatkan koloni yang benar-benar murni. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Tahap pemurnian dapat dilakukan 2-3 kali, untuk lebih meyakinkan bahwa koloni yang terbentuk benar-benar murni atau tidak. Setiap koloni tunggal yang berbeda baik bentuk koloni, warna, hingga bentuk dan gram setelah pemurnian kemudian ditanam pada medium SIM (*Sulfit Indo Motility*) untuk persiapan pengujian selanjutnya (Hardiningsih, *et al*, 2006).

#### **4. Uji GKO (Gram, Katalase, Oksidase)**

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan teknik pewarnaan gram, katalase, oksidase. Pertama-tama ulasan bakteri dibuat pada gelas objek dan dilakukan fiksasi. Sebanyak 1-2 tetes gram A (kristal violet) ditetaskan pada koloni bakteri, diamkan selama 60 detik. Kemudian preparat dicuci dengan menggunakan air mengalir lalu dianginkan. Sebanyak 2-3 tetes gram B (larutan lugol) ditetaskan di atas preparat dan dibiarkan selama 60 detik. Preparat dicuci dengan air mengalir lalu di keringkan. Preparat kemudian ditetesi 2-3 tetes larutan alkohol-aseton dan dibiarkan selama 60 detik lalu dicuci kembali dan dikeringkan. Selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan safranin sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 60 detik, lalu dicuci dan dikeringkan. Setelah itu diamati dibawah mikroskop, (Pratiwi, 2008).

### 3.5 Batasan Variabel

#### 1. Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)

Lele dumbo merupakan salah satu diantara beberapa jenis ikan lele yang banyak dibudidayakan baik secara tradisional maupun secara intensif. Sejumlah pembudidaya mengatakan lele dumbo adalah hasil kawin silang dua species ikan lele, yaitu antara lele betina *Clarias fuscus* dari Taiwan dan lele jantan *Clarias mossambicus* dari Kenya, Afrika. Ciri-ciri lele dumbo (*Clarias gariepinus*) diantaranya :

- Bentuk tubuhnya memanjang, tidak memiliki sisik dan licin.
- Bagian dorsalnya mempunyai warna hitam dan bagian ventralnya memiliki warna putih susu.
- Sirip di bagian dadanya sudah berubah menjadi patil.
- Sungutnya memiliki empat pasang.
- Ukuran tubuh berukuran kira-kira 3 kali lebih besar dari lele lokal
- Mencari makanannya di malam hari (*nocturnal*).
- Lele tergolong dalam ikan pemakan campuran (*omnivor*), tetapi condong sebagai karnivor.
- Tidak demikian menyenangi cahaya/sinar (*Photopobi*).
- Memiliki alat pernapasan tambahan (*arborescent*).

Sedangkan perbedaan lele dumbo dengan lele lokal adalah pertumbuhan lele dumbo relatif lebih cepat dibanding lele lokal, lele dumbo mempunyai tubuh lebih

panjang dan gemuk dibandingkan lele lokal, tubuh lele dumbo berwarna kehitaman dengan bercak putih kusam tidak beraturan seperti panu, sedangkan lele lokal ada yang berwarna hijau tua kehitaman atau hitam merata dengan perut berwarna keputihan (Suyanto, 2007).

Ikan air tawar yang sangat populer dikalangan masyarakat Indonesia adalah ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Jenis ikan ini banyak dibudidayakan oleh para petani karena ikan lele dumbo mempunyai nilai ekonomis yang tinggi, memiliki kemampuan beradaptasi terhadap lingkungan yang tinggi, pertumbuhannya cepat serta mudah untuk dibudidayakan. Maka tak heran, banyak masyarakat yang berminat untuk membudidayakan ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) (BBAT Sukabumi, 2005).

## 2. Bakteri patogen

Bakteri patogen merupakan bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan infeksi hingga kematian pada ikan. Dalam suatu kondisi dimana kadar bahan organik pada air sangat tinggi, akan banyak terdapat bakteri patogen. Bahkan beberapa peneliti mengatakan bahwa bakteri mikroflora yang banyak didapatkan pada usus ikan akan sesuai jenisnya dengan bakteri yang ada dalam lingkungan perairan tersebut. Penyakit bakteri pada ikan ini cukup banyak menimbulkan kerugian selain menurunkan mutu daging ikan juga akhirnya dalam tingkatan yang akut akan menyebabkan kematian ikan. Kematian yang ditimbulkannya menurut para pembudidaya ikan dapat mencapai 50 – 60%. Bakteri yang dapat menginfeksi ikan dikenal ada bermacam-macam bentuk



dimana masing-masing bentuk akan memberikan gambaran efek infeksi yang berlainan. Bentuk-bentuk bakteri yang bersifat patogenik bagi ikan adalah: bakteri berbentuk bulat (coccus), bentuk bulat bergabung dua sel (diplococcus), bakteri bentuk bulat bergabung seperti rantai (streptococcus), bakteri bulat berkelompok beberapa sel (staphylococcus), bakteri berbentuk batang (bacillus), bakteri berbentuk koma (vibrio).

Berbagai jenis bakteri yang dapat menginfeksi ikan dan menimbulkan gejala-gejala klinis misalnya pendarahan, borok, sirip yang hancur dan lesi. Penyakit pada ikan (patogen) hampir selalu terdapat dalam kolam, di permukaan tubuh ikan dan pada bagian tubuh ikan (usus atau organ dalam lainnya) yaitu antara lain: *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium*, *Aeromonas hydrophila* dan *Nocardia asteroides* (Afrianto dan Liviawaty, 2006).

Menurut Pusat Karantina Ikan (2010), gejala klinis ikan yang terinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda* ditandai adanya luka pada bagian tubuh / organ yang terinfeksi. Pada infeksi ringan penyakit yang disebabkan bakteri ini hanya menimbulkan luka-luka kecil dengan ukuran 3 – 5 mm. Bakteri *Edwardsiella tarda* adalah penyebab penyakit *Edwardseilosis/Emphisemathous Putrevactive Disease of Catfish* (EPDC). Bakteri *Edwardsiella tarda* hidup secara alamiah di perairan tawar dan laut khususnya pada perairan yang banyak mengandung bahan organik dan ditemukan juga di tanah dan lumpur.